

10/525 621  
Rec'd PCT/PTO 22 FEB 2005

PCT/JP 03/10434 (#2)

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

19.08.03

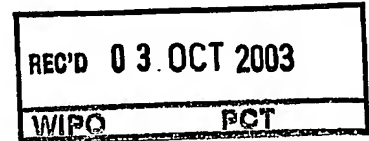
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 8月22日

出願番号  
Application Number: 特願2002-241487  
[ST. 10/C]: [JP 2002-241487]

出願人  
Applicant(s): エーザイ株式会社

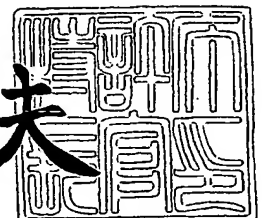


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0201

【提出日】 平成14年 8月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市中京区壬生辻町 3 1 - 1 ライオンズマンシ  
                                ョン四条大宮 1 1 1 1

    【氏名】 清末 優子

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市栄区本郷台二丁目 2 4 番 1 3 号

    【氏名】 佐々木 博之

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市中京区堺町通二条上ル亀屋町 1 6 7 グラン  
                                フォルム京都御所南 5 0 2

    【氏名】 月田 承一郎

【特許出願人】

    【識別番号】 000000217

    【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

    【代表者】 内藤 晴夫

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異型APCタンパク質発現細胞、およびその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞の重層化を誘導し得る機能を有することを特徴とする変異型APCタンパク質。

【請求項2】 APCタンパク質の少なくとも以下の(a)～(c)のいずれかのアミノ酸領域が欠損した、請求項1に記載の変異型APCタンパク質。

(a) 配列番号: 1に記載のAPCタンパク質において、2827位のアミノ酸以降のC末端側アミノ酸領域

(b) 配列番号: 1に記載のAPCタンパク質において、2159位のアミノ酸以降のC末端側アミノ酸領域

(c) 配列番号: 1に記載のAPCタンパク質において、860位のアミノ酸以降のC末端側アミノ酸領域

【請求項3】 アフリカツメガエル由来である、請求項1または2に記載の変異型APCタンパク質。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の変異型APCタンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入したアミノ酸配列からなる、細胞の重層化を誘導し得る変異型APCタンパク質。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の変異型APCタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項5に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項7】 人為的に発現させた請求項1～4のいずれかに記載の変異型APCタンパク質または請求項6に記載のベクターを有する細胞。

【請求項8】 哺乳動物由来である、請求項7に記載の細胞。

【請求項9】 アフリカツメガエル由来である、請求項7に記載の細胞。

【請求項10】 樹立された細胞株である、請求項7～9のいずれかに記載の細胞。

【請求項11】 以下の工程(a)～(c)を含む、細胞の重層化阻害剤の

候補化合物のスクリーニング方法。

- (a) 請求項 7～9 のいずれかに記載の細胞と被検化合物を接触させる工程、
- (b) 上記細胞の重層化を検出する工程、
- (c) 重層化を阻害する化合物を選択する工程

【請求項 1 2】 以下の工程 (a) ～ (d) を含む、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC 蛋白質をコードするポリヌクレオチドをスクリーニングする方法。

- (a) アフリカツメガエル由来の細胞に、被検ポリヌクレオチドを導入して変異型 APC 蛋白質を発現させる工程、
- (b) 上記細胞を培養する工程、
- (c) 上記細胞の重層化を検出する工程、
- (d) 上記細胞を重層化させるポリヌクレオチドを選択する工程

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC タンパク質、および該タンパク質を発現する細胞に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子は、家族性大腸腺腫症 (FAP) の原因遺伝子として同定された癌抑制遺伝子であるが、APC 遺伝子の変異は FAP に限らず非遺伝性の大腸腺腫や大腸癌の発生に関与していることが明らかにされている。FAP 患者では大腸に多数の良性ポリープを形成し、その中から悪性化した癌細胞が出現する。大腸癌は、多数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子に多段階的に変異が起きて発症するが、APC 遺伝子の変異は最も早期に発見されており、APC 遺伝子の異常が大腸癌発症の原因と考えられている。

【0 0 0 3】

APC タンパク質 (以下、APC) は、2843 アミノ酸からなる分子量約 310kDa の大き

なタンパク質で、多数のタンパク質と結合する。これまでに、脱リン酸化酵素PP2A B56サブユニット、APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor (Asef)、キネシンファミリーに属する微小管関連モータータンパク質KAP3/KIF3A/KIF3B複合体、Wntシグナル伝達系構成因子である $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$ /Axin、細胞骨格成分である微小管、微小管結合タンパク質EB/RPファミリー・タンパク質、細胞周期調節因子p34cdc2リン酸化酵素、アポトーシス関連タンパク質Siah-1、癌抑制遺伝子産物hDLGと直接結合することが報告されている。FAP患者のポリープ及び大腸癌細胞では、APCの対立遺伝子の両方に変異が生じており、途中で切断されてC末端領域を欠失した変異型APCのみが発現されている。この変異型APCが異常な機能を有することにより、細胞が癌化すると考えられている。

#### 【0004】

APCは $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$ /Axinと複合体を形成して $\beta$ -cateninの分解を促進し、その存在量を低く維持する機能があることが報告されている。 $\beta$ -cateninが多量に存在すると、核に移行して転写因子と結合し細胞増殖を促進するため、当初、APCは $\beta$ -cateninの存在量を制御することで癌抑制タンパク質として機能していると考えられた。しかしながら、FAPモデルマウスを用いたポリープ形成過程の詳細な観察から、ポリープ内では細胞増殖の促進は起こっておらず、上皮細胞としての細胞間接着構造を維持しつつ本来とは異なる形態をとることによってポリープを形成していることが明らかにされ、APCが細胞形態や運動の制御に関与していると考えられるようになっていく。さらに、APCが、アクチン細胞骨格の制御機能を持つAsefや、微小管と結合することが見出され、APCが細胞骨格の制御に関わっている可能性が考えられ始めている。

#### 【0005】

正常及び変異型APCの細胞形態や運動に関わる機能を明らかにし、ポリープ形成及び癌化の原因の解明が望まれていた。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、正常および変異型APCの細胞形態や運動に関わる機能を明らかにすることにある。さら

に本発明は、得られた知見を基に変異型APCタンパク質の用途を提供することにある。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、APCの機能を詳細に明らかにするために、自家蛍光タンパク質 (GFP; green fluorescent protein) で標識した全長及び変異型APCを上皮細胞に発現させた。融合タンパク質cDNAを細胞へ導入し、薬剤耐性を利用して融合タンパク質を安定的に発現する独立な (independent) クローンを数株ずつ単離したところ、異なる構造の変異型APC発現細胞を発現するそれぞれのクローンにおいて共通して、細胞層の隆起が観察された。電顕微鏡観察において、細胞間隙が増加して細胞接着が弱化し、細胞が重層化していることが認められた。全長APCを発現する細胞株では、細胞の重層化は起こらず、細胞接着はより強化された。免疫組織染色によって、重層化した細胞群は細胞間接着構造を保持していることが確認された。以上の結果より、変異型APCは細胞の重層化を引き起こすことを見出し、本発明を完成するに至った。変異型APCを発現する細胞は、細胞間接着構造を保持しているが、細胞の重層化が見られるという現象は、本発明者らによって初めて見出された知見である。

#### 【0008】

本発明の変異型APCは、正常上皮細胞の単層性を阻害し、細胞間接着を維持させながら細胞を重層させることから、本発明の変異型APCを発現する細胞は、ポリプ形成現象のモデル細胞として有用である。さらに、本発明の変異型APCを発現する細胞は、細胞の重層化を阻害する化合物のスクリーニングに利用することが可能である。

#### 【0009】

即ち本発明は、細胞の重層化を誘導し得る変異型APCタンパク質、および該タンパク質を発現する細胞、並びに該細胞の用途に関し、より具体的には、

- 〔1〕 細胞の重層化を誘導し得る機能を有することを特徴とする変異型APCタンパク質、
- 〔2〕 APCタンパク質の少なくとも以下の (a) ~ (c) のいずれかのアミ

ノ酸領域が欠損した、〔1〕に記載の変異型APCタンパク質、

(a) 配列番号: 1に記載のAPCタンパク質において、2827位のアミノ酸以降のC末端側アミノ酸領域

(b) 配列番号: 1に記載のAPCタンパク質において、2159位のアミノ酸以降のC末端側アミノ酸領域

(c) 配列番号: 1に記載のAPCタンパク質において、860位のアミノ酸以降のC末端側アミノ酸領域

〔3〕 アフリカツメガエル由来である、〔1〕または〔2〕に記載の変異型APCタンパク質、

〔4〕 〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の変異型APCタンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる、細胞の重層化を誘導し得る変異型APCタンパク質、

〔5〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の変異型APCタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

〔6〕 〔5〕に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

〔7〕 人為的に発現させた〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の変異型APCタンパク質または〔6〕に記載のベクターを有する細胞、

〔8〕 哺乳動物由来である、〔7〕に記載の細胞、

〔9〕 アフリカツメガエル由来である、〔7〕に記載の細胞、

〔10〕 樹立された細胞株である、〔7〕～〔9〕のいずれかに記載の細胞、

〔11〕 以下の工程(a)～(c)を含む、細胞の重層化阻害剤の候補化合物のスクリーニング方法、

(a) 〔7〕～〔9〕のいずれかに記載の細胞と被検化合物を接触させる工程、

(b) 上記細胞の重層化を検出する工程、

(c) 重層化を阻害する化合物を選択する工程

〔12〕 以下の工程(a)～(d)を含む、細胞の重層化を誘導し得る変異型APC蛋白質をコードするポリヌクレオチドをスクリーニングする方法。

(a) アフリカツメガエル由来の細胞に、被検ポリヌクレオチドを導入して変異



型APC蛋白質を発現させる工程、

(b) 上記細胞を培養する工程、

(c) 上記細胞の重層化を検出する工程、

(d) 上記細胞を重層化させるポリヌクレオチドを選択する工程

を、提供するものである。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、変異型APCタンパク質（本明細書においては「変異型APC」と略記する場合あり）を提供する。細胞において本発明の変異型APCが発現することにより、細胞の重層化が誘導される。本発明の変異型APCは、本発明者らによって細胞間接着を維持しながら細胞の重層化を誘因するタンパク質として特定されたものである。

#### 【0011】

本発明において「変異型」とは、正常APCタンパク質のアミノ酸配列において、単一または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入されたタンパク質を指す。また、上記「変異」は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的変異であってもよく、あるいは非保存的置換を伴う変異であってもよい。つまり、本発明の変異型APCは、細胞の重層化を誘導し得る機能を有するものであれば、その変異の種類は特に制限されない。本発明における変異型APCは、通常、人為的に作製（もしくは正常APCを基に改変）、あるいは単離・精製されたものである。

#### 【0012】

また、APCタンパク質は、これまでのところ種々の生物において見出されている。これらの正常APCタンパク質のアミノ酸配列は、公共のデータベースから容易に入手することができる。例えば、ヒトのAPCタンパク質のアミノ酸配列のGenBankのアクセッション番号はM74088であり、アフリカツメガエルのAPCタンパク質のアミノ酸配列はGenBankのアクセッション番号はU64442である。アフリカツメガエルのAPCタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1に記載する。

#### 【0013】

本発明の変異型APCは、特定の種のAPCの変異体に限定されない。本発明の変異型APCの一例としては、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるアフリカツメガエルのAPCタンパク質の変異体を挙げることができる。

#### 【0014】

本発明の好ましい態様においては、変異型APCは、正常APCの一部のアミノ酸領域が欠失されたタンパク質（切断型APCタンパク質）である。

#### 【0015】

本発明の変異型APCは、通常、C末端の3つのアミノ酸TSV配列（DLG結合領域）を欠失したものである。このTSV配列は、PDZタンパク質結合モチーフとされており、この領域で、PDZタンパク質の一つのhDLGタンパク質と結合することが報告されている（Matsumine A, et al., Science (1996);272(5264):1020-3）。また本発明の変異型APCは、少なくとも「heptad repeats」および「armadillo repeats」を含むN末端アミノ酸領域を有することが好ましい。具体的には本発明の変異型APCとして、下記の（a）～（c）のいずれかのアミノ酸領域が少なくとも欠損した構造を有するタンパク質を挙げることができる。

（a）C末端のTSV配列（DLG結合領域）、より具体的には、配列番号：1に記載のAPCタンパク質において、2827位のアミノ酸以降のC末側アミノ酸領域

（b）C末端側の酸性領域(basic region)およびTSV配列、より具体的には、配列番号：1に記載のAPCタンパク質において、2159位のアミノ酸以降のC末側アミノ酸領域

（c）15アミノ酸リピート(15a. a. repeats)、20アミノ酸リピート(20a. a. repeats)、C末端側の酸性領域(basic region)およびTSV配列、より具体的には、配列番号：1に記載のAPCタンパク質において、860位のアミノ酸以降のC末側アミノ酸領域

#### 【0016】

また、上記のタンパク質において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものであって、細胞の重層化を誘導し得る機能を有するタンパク質もまた、本発明に含まれる。このタンパク質を調製するための方法としては、例えば、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増

幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4) を利用して、上記変異型 APC をコードする DNA 配列またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から本発明のタンパク質を得ることは、通常行いうることである。このように単離されたタンパク質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされるタンパク質であって、細胞の重層化を誘導し得る機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

#### 【 0 0 1 7 】

変異型 APC において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA を単離するためのストリンジентなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

#### 【 0 0 1 8 】

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA によってコードされるポリペプチドは、通常、本発明の変異型 APC とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも 40% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは少なくとも 95% 以上、さらに好ましくは少なくとも 97% 以上（例えば、98～99%）の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altsc

hul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

#### 【0019】

本発明において、「細胞の重層化」とは、例えば、以下のような細胞の状態（形態）であるものと、記述することができるが、通常、正確に定義することは困難であるため、下記の状態に特に制限されるものではない。

- (a) 異なる細胞の核が高さ方向に複数重なって観察される。
- (b) 細胞体が、細胞層から遊離せず、単層状態の細胞（例えば、A6細胞）の平均的な高さ（2-4  $\mu\text{m}$ ）よりも明らかに高い位置に存在する。
- (c) 電子顕微鏡レベルでは明らかに細胞体や細胞核が高さ方向に複数存在して見られる領域は、光学顕微鏡レベル（位相差顕微鏡法）では細胞単層に”しわ”が寄りうねったように観察される。

#### 【0020】

本発明において、細胞の重層化を誘導し得るタンパク質であるか否かは、当業者においては公知の方法により判定することができる。例えば、対象となるタンパク質を発現する細胞について、位相差顕微鏡または蛍光抗体法によって、細胞が重層化されているか否かを容易に確認することができる。

#### 【0021】

本発明の変異型APCは、例えば、正常APCタンパク質をコードするDNAの塩基配列を基に、当業者においては、一般的に周知の方法（PCR法等）を利用して作製することができる。例えば、上記の変異型APCタンパク質の作製は、通常、該タンパク質をコードするDNAを正常APCのcDNAまたはゲノムDNAを鋳型とするPCR法により増幅し、該DNAを発現ベクターへクローニングすることによって実施すること

ができる。正常APCのcDNAは、当業者においては公知の方法、例えば、正常APCを発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、APC cDNAの一部をプローブとするハイブリダイゼーションを行うことにより取得することができる。cDNAライブラリーは、例えば、文献 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。

#### 【0022】

上記変異型APCは、より具体的には、後述の実施例で示す方法により作製することができる。当業者においては、後述の実施例に示す方法を適宜改変して、正常APCの任意のアミノ酸領域を有する変異型APCを作製することが可能である。

#### 【0023】

また、本発明の変異型APCは、正常APCタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列）を改変することによって作製することができる。例えば、アミノ酸配列の改変は、部位特異的変異誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)) 等の周知の方法により正常APCタンパク質をコードするDNAの塩基配列を改変し、塩基配列が改変されたDNAを適当な細胞において発現させることにより行うことができる。タンパク質中のアミノ酸の変異は、自然界（天然）において生じることもあり、本発明のタンパク質には、細胞間接着を維持しながら細胞の重層化を誘導し得る機能を有する限り、単離された天然のAPCタンパク質変異体も含まれるが、通常、本発明の変異型APCは人為的に作出されたものである。

#### 【0024】

本発明の変異型APCは、当業者に公知の方法により、組み換えポリペプチドとして調製することが可能である。組み換えポリペプチドは例えば、本発明の変異型APCをコードするDNAを、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明の変異体に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、

さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより調製（精製）することが可能である。

#### 【0025】

また、本発明の変異型APCをグルタチオン S-トランスフェラーゼ蛋白質との融合ポリペプチドとして、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えポリペプチドとして宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換えポリペプチドはグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。融合ポリペプチドの精製後、必要に応じて融合ポリペプチドのうち、目的の変異体以外の領域を、トロンビンまたはファクター-Xaなどにより切断し、除去することも可能である。

#### 【0026】

また、本発明の変異型APCをコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。該ポリヌクレオチドには、本発明の変異型APCをコードするDNA、および該DNAの転写産物であるRNAが含まれる。

#### 【0027】

さらに本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターは、細胞において本発明の変異型APCを発現させるため、あるいは、本発明の変異型APCを生産させるために有用である。

#### 【0028】

上記ベクターは、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、適当な薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールにより選択できるような薬剤耐性遺伝子）を有するものであれば特に制限されない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script等が挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とする場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7等が挙げられる。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を

有する以外に、宿主をJM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーター等を有することが望ましい。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)等が挙げられる。

#### 【0029】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

#### 【0030】

大腸菌以外にも、例えば、本発明の変異型APCを発現させるためのベクターとして、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

#### 【0031】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーター等

を有することが望ましく、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により選択できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13等が挙げられる。

#### 【 0 0 3 2 】

また、動物の生体内で本発明の変異型APCを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えばpAdex1cw）やレトロウイルスベクター（例えばpZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning, 5.61-5.63）。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

#### 【 0 0 3 3 】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された細胞を提供する。本発明の好ましい態様においては、該細胞は、人為的に本発明の変異型APCを発現させた細胞（例えば、変異型APCを人為的に導入し発現させた細胞）である。本発明のベクターが導入される細胞は特に制限されず、例えば、大腸菌や種々の動物細胞等を用いることが可能である。本発明の好ましい態様においては、該細胞は本発明の変異型APCの発現により、細胞間接着を維持しながら細胞の重層化が見られることを特徴とする上皮細胞である。本発明の細胞は、より好ましくは、本発明の変異型APCを安定的に発現する樹立された細胞株である。また本発明の細胞は、好ましくは動物由来の細胞であり、より好ましくはアフリカツメガエル由来の細胞（例えば、A6細胞）である。

#### 【 0 0 3 4 】

本発明の変異型APCを発現する細胞は、実際のAPC変異によるポリープ形成細胞と類似していると考えられる。家族性大腸腺腫症(FAP)患者の場合、初期段階において正常な細胞間接着を形成し、浸潤性を持たず、まだ悪性化していない良性



のポリープを形成する。通常、このようなポリープが数百～数千形成され、これを切除せずに放置しておく、その中からAPC以外の遺伝子にも変異を生じることにより悪性化した細胞が出現し、この時点で癌化するものと考えられている。本発明の変異型APCを発現する細胞は、APCのみの変異を模倣した状態であると言え、ポリープ形成または癌化の原因解明のための研究材料として有用である。

### 【0035】

また、本発明の細胞は、細胞の重層化を阻害する化合物のスクリーニングに有用である。本発明の変異型APCを発現する細胞がアフリカツメガエル由来の細胞である場合には、該細胞は、室温、非二酸化炭素環境下で培養できる利点を有する。

### 【0036】

本発明の細胞は、本発明の変異型APCの製造や発現のための産生系として使用することができる。本発明の変異型APCの製造のための産生系は、*in vitro*および*in vivo*の産生系がある。*in vitro*の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

### 【0037】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル細胞、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP (ペーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクション等の方法で行うことが可能である。

### 【0038】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌等が知られている。

#### 【0039】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりポリペプチドが得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。

#### 【0040】

また、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に本発明の変異型APCをコードするDNAを導入し、動物又は植物の体内で変異型APCを産生させ、回収する。

#### 【0041】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

#### 【0042】

例えば、本発明の変異型APCをコードするDNAを、ヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、本発明の変異型APCを得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

#### 【0043】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、本発明の変異型APCをコードするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から該変異型APCを得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

#### 【0044】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、本発明の変異型APCをコードするDNAを植物発現用ベクター、例えば pMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より本発明の変異型APCを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

#### 【0045】

これにより得られた本発明の変異型APCは、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なポリペプチドとして精製することができる。ポリペプチドの分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればポリペプチドを分離、精製することができる。

#### 【0046】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明には、これらの精製

方法を用い、高度に精製された変異型APCも含まれる。

#### 【0047】

一般的に、Wntシグナル伝達系のアッセイとして、アフリカツメガエルの卵にWntシグナル因子のmRNA、抗体等を微量注入してその後の発生に与える影響を調べる方法が広く用いられている (Gloy J, et al., Nat Cell Biol (2002) 4(5):351-357)。APCやAPC結合タンパク質である $\beta$ -cateninやaxinもこの手法が用いられ、オタマジャクシの頭が双頭になったり頭が正常形成されなかったりする現象により、Wntシグナル伝達系における機能が議論されている。従って、この種の実験において本発明の精製された変異型APCを利用することも可能である。

#### 【0048】

また本発明は、細胞の重層化阻害剤のための候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、(a) 本発明の変異型APCを発現する細胞と被検化合物を接触させる工程、(b) 該細胞の重層化を検出する工程、および(c) 重層化を阻害する化合物を選択する工程を含む。

#### 【0049】

本発明のスクリーニング方法に用いる被検化合物としては特に制限はなく、例えば、合成低分子化合物のライブラリー、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清等が挙げられる。

#### 【0050】

上記工程(a)の「接触」は通常、本発明の変異型APCを発現する細胞の培養液へ、被検化合物を添加することにより実施することができるが、この方法に特に制限されない。

#### 【0051】

上記工程(b)における「細胞の重層化の検出」は、当業者においては上述した方法(例えば、位相差顕微鏡を利用した方法等)により実施することができる。

#### 【0052】

上記工程(c)においては、通常、細胞へ被検化合物を接触させない場合と比

較して、細胞の重層化の程度が低下している場合、細胞の重層化は阻害されると判定される。

#### 【0053】

多くの癌細胞において細胞の重層化が見られることから、細胞の重層化を阻害する化合物は、抗腫瘍活性を有することが期待される。従って、本発明の上記スクリーニング方法によって選択される化合物は、抗腫瘍活性を有することが期待できる。即ち、該化合物を有効成分として含有する細胞の重層化阻害剤は、抗腫瘍剤となり得る。

#### 【0054】

また、従来のin vitroの培養細胞のシステムにおいては、癌タンパク質(oncoprotein) RasやSrcによる” 繊維芽細胞” のトランスフォーメーション(transformation)アッセイが広く用いられていた。これは、細胞が足場依存性を失って増殖を続けるために、何処にも接着していない細胞が増加して光学顕微鏡で検出し得る” focus” を形成する現象を見るものである。RasやSrc、あるいはいくつかの癌遺伝子を上皮細胞に発現させると、ほとんどのケースで細胞間接着が失われ、さらに上皮の極性が失われて、繊維芽細胞・間充織細胞様の形態になることが知られている。本発明の細胞は、従来の細胞とは異なり、細胞間接着を維持したまま重層する細胞であることから、該細胞を利用した本発明の方法においては、従来の方法では取得するのが困難であった化合物（例えば、「上皮細胞の重層化」を特異的に阻害する化合物）のスクリーニングが可能となった。

#### 【0055】

多くの癌は上皮細胞由来であるのに関わらず、培養細胞を用いたアッセイ系は上述の繊維芽細胞を用いた” focus” 形成アッセイが主なものであった。上皮細胞を用いたアッセイ系の開発は、多くの種類の癌細胞に対してより有効なスクリーニング系を提供する可能性がある。また、上皮細胞が単層を維持する機構を解明する材料としても有用である。

#### 【0056】

本発明には、上記スクリーニング方法によって取得される化合物、および該化合物を有効成分として含有する細胞の重層化阻害剤、あるいは抗腫瘍剤も含まれ

る。

#### 【0057】

本発明の上記薬剤は、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ペヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが可能である。

#### 【0058】

また本発明は、細胞の重層化を誘導し得る変異型APCをコードするポリヌクレオチドをスクリーニングする方法に関する。該スクリーニング方法は、アフリカツメガエル由来の細胞に、被検ポリヌクレオチドを導入して変異型APC蛋白質を発現させる工程、上記細胞を培養する工程、上記細胞の重層化を検出する工程、および上記細胞を重層化するポリヌクレオチドを選択する工程、を含む。

#### 【0059】

本発明の好ましい態様においては、被検者のAPCをコードするポリヌクレオチドを被検試料とすることにより、該ポリヌクレオチドがポリープの原因となるか否かについて検査することが可能である。通常、被検ポリヌクレオチドは、細胞において発現可能なように適当な発現ベクターへ組み込まれ、細胞へ導入される。当業者においては、適宜、発現ベクターを選択し、一般的な遺伝子工学技術を用いて、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築することができる。該発現ベクターの細胞への導入は、周知の方法、例えば、上述のエレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等により、実施することができる。

#### 【0060】

上記スクリーニング方法に使用されるアフリカツメガエル由来の細胞としては、例えば、A6細胞を示すことができる。また、細胞の重層化は、例えば、位相差顕微鏡を利用した方法により検出することができる。より具体的には、後述の実施例で示す方法によって細胞の形態を詳細に観察することにより、細胞の重層化の検出を行うことができる。本スクリーニング方法においては、被検ポリヌクレオチドを発現させた細胞において重層化が見られる場合に、該ポリヌクレオチド

は細胞の重層化を誘導し得る変異型APCをコードしているものと判定される。

#### 【0061】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、実施例に使用する抗体および細胞は下記の通りである。抗ZO-1モノクローナル抗体 (Clone:T8-754) は、三光純薬から購入した。核酸を選択的に染色するTOTO-3は、Molecular probe社から購入した。A6細胞 (アフリカツメガエル*Xenopus laevis*腎臓由来上皮細胞株) は、10%ウシ胎児血清を含むLeivobitz's L-15培養液 (GIBCO BRL) 中にて、23℃、非二酸化炭素環境中で増殖させた。実施例2に示す理由により、アフリカツメガエルの遺伝子と細胞を選択した。

#### 【0062】

【実施例1】 自家蛍光タンパク質GFP(green fluorescent protein)融合APCの作成

APCの機能を詳細に明らかにするために、常法を用いて、APCの異なる部位を含むcDNAを自家蛍光タンパク質GFP(green fluorescent protein)cDNAを融合した発現ベクターを作成した (図1)。

#### 【0063】

アフリカツメガエルAPC遺伝子の配列は既知であり、GenBank (U64442) に報告されている。各々の発現ベクターは、以下の手順で作成された。

#### 【0064】

(a) GFP-fAPC: GFPを融合した全長APCを発現するためのベクターである。全長APCを含む発現ベクター、pGFP-C(NheI)/APC(1-8490)及びpQBI25/APC(1-8487)は、発明者らによって既に論文報告されている(Mimori-Kiyosue Y. et al., J. Cell Biol. 148(3): 505-18, 2000)。GFP-fAPC発現ベクターを構築するため、まず、pGFP-C(NheI)/APC(1-8490)からXbaIを用いて切り出したAPCの3'領域を含むcDNAを、pEGFP-C1 (Clontech社)のXbaIサイトに挿入した。次に、このベクターのSacII-BamHIサイトに、pQBI25/APC(1-8487)からSacIIとBamHIによって切り出したcDNAを挿入した。最後に、このベクターのBamHI-NotIサイトに、pGFP-C(Nhe

I)/APC(1-8490)からBamHIとNotIを用いて切り出したcDNAを挿入し、完全長APCを含むベクターを構築した (APC/pEGFP-C1)。

【0065】

(b) GFP-APC( $\Delta$ TSV): APCのC末端の3アミノ酸、TSVを欠失したAPCを発現するベクターである。APCの2089-2826アミノ酸をコードする遺伝子は、pGFP-C(NheI)/APC(1-8490)をテンプレートとし、以下のプライマーを用いてPCRにより作成した。

CGACGCGTAATGCATTTTCTCCAGACTCTG (配列番号: 2)

GGAATTCGGATCCTCACACCAGATAAGAACCAGAGTGCC (配列番号: 3)

【0066】

このPCR産物はSpeIとEcoRIで切断し、pGFP-C(NheI)ベクターのNheI-EcoRIサイトに挿入した (APC(6475-8478)/pGFP-C(NheI))。このベクターをPvuIとNotIで切断し、得られた断片を同酵素で切断したAPC/pEGFP-C1に挿入した。

【0067】

(c)  $\Delta$ cAPC-GFP: このタンパク質を発現するベクターは、既に発明者らによって論文報告されている (Mimori-Kiyosue Y. et al., J. Cell Biol. 148(3): 505-18, 2000)。

【0068】

(d) nAPC-GFP: APCのN末端領域のみを発現するためのベクターである。APCのN末端の859アミノ酸をコードする遺伝子は、pGFP-C(NheI)/APC(1-8490)をテンプレートとし、以下のプライマーを用いてPCRにより作成した。

CGACGCGTATGGCTGCTGCTTCGTATGATCAGT (配列番号: 4)

CGACGCGTACCTGCTGTTCTTCCCTGTC (配列番号: 5)

【0069】

このPCR産物はMluIで切断し、pGFP(MluI)ベクター (発明者らにより報告) のMluIサイトに挿入した。

【0070】

(e) mAPC-GFP: APCの中央領域のみを発現するためのベクターである。まず、以下のプライマーを用いてPCRによりAPCの860-1120アミノ酸をコードする遺伝子



をを作成した。

CTAGCTAGCCTCGGCAACTACCATTCG (配列番号：6)

ATTAGAGCTCACTCTAGAC (配列番号：7)

#### 【0071】

このPCR産物をNheIと XbaIで切断し、pQBI25ベクターのNheIサイトに挿入した。次に、このベクターをEcoRIで切断し、 $\Delta$ cAPC-GFPからEcoRIで切り出したAPCの中央領域を含むフラグメントを挿入した。最後に、このベクターをHindIIIとApaIで切断し、 $\Delta$ cAPC-GFPからHindIIIとApaIで切り出したフラグメントを挿入した。

#### 【0072】

(f) GFP-cAPC: APCのC末端領域のみを発現するためのベクターである。このタンパク質を発現するベクターは、既に発明者らによって論文報告されている (Mimori-Kiyosue et al., J. cell Biol., 148(3):505-18, 2000)。

#### 【0073】

[実施例2] cDNAのA6細胞への導入及びスクリーニング

実施例1で得られたベクターをA6細胞に導入して安定発現株の樹立を試みた。

#### 【0074】

多くの哺乳類由来培養細胞株において、APCの発現は非常に困難であり、これまでに全長APCをコンディショナルに発現する細胞株についての報告 (Morin P. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7950-4, 1996)はあるものの、外来の全長及び変異型APCを安定的に発現する細胞株の樹立は報告されていない。そこで、A6細胞がAPCの発現に適当であるかどうかを検討した。

#### 【0075】

まず、pQBI25ベクター (QBI0gene社)、Effectene transfection 試薬 (Qiagen社)を用いてGFP単体をA6細胞に発現させる予備実験を行い、蛍光染色像を蛍光顕微鏡で観察し、GFPが発現されることを確認した。さらに、GFP以外の明瞭な蛍光シグナルを呈する細胞は、調べた限りにおいては存在しなかった。pQBI25ベクター導入後48~72時間後に0.6~0.8 mg/mlのG418 sulfate (Calbiochem社)存在下で培養を開始し、耐性クローンを選択したが、A6細胞は容易に耐性クローンの

コロニーを形成することが確認された。さらに、実施例1に示す発現ベクターを導入したところ、GFPの蛍光を発する細胞が増殖し得ることが確認された。これらの実験は、A6細胞の通常の培養環境である、室温、非二酸化炭素環境中で行われた。これらの結果から、この細胞株がGFP融合APCを発現する蛋白質の視覚的スクリーニングに適當であるということを確認した。

#### 【0076】

実施例1に示した各cDNAは、上記と同様の条件で細胞に導入し、蛍光顕微鏡下でGFPの蛍光を検出することによりスクリーニングを行った。各コンストラクトについて、安定的に発現する細胞株を樹立した。

#### 【0077】

〔実施例3〕 GFP融合全長及び変異型APC発現細胞の位相差顕微鏡法による形態観察

実施例2で得られたGFP融合全長及び変異型APC発現細胞の形態を、位相差顕微鏡法により観察し、parental A6細胞のそれと比較した。細胞を100%コンフルエント密度でディッシュに撒き、毎日培地を交換しながら10～15日間培養すると、parental A6細胞とGFP-fAPC、mAPC-GFP、GFP-cAPC発現細胞は上皮の形態を持つ平坦な単層構造となるが、GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP発現細胞では、一定の頻度(100～数100 $\mu$ m間隔)で細胞層が平坦ではなく隆起した領域が出現した(図2)。

#### 【0078】

〔実施例4〕 GFP融合全長及び変異型APC発現細胞の電子顕微鏡観察

実施例2で得られたGFP融合全長及び変異型APC発現細胞の形態を詳細に観察するため、電子顕微鏡観察を行った(図3)。各細胞を、リン酸緩衝液を用いて調整した1%グルタルアルデヒド水溶液中で固定し、常法により試料作成を行い、走査型電子顕微鏡法により細胞表面の構造を観察した。parental A6細胞とGFP-fAPC発現細胞においては、細密充填された細胞の頂端膜が平坦に連なり、頂端膜上の微絨毛やprimary cilia構造の突出のみが観察された。それに対し、GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP発現細胞では、数個～数10個の細胞が隆起し、平坦な細胞単層でない領域の出現が観察された。

## 【0079】

次に、1%グルタルアルデヒド水溶液中で固定した細胞を常法により超薄切片を作成、透過型電子顕微鏡法により細胞縦断面の観察を行った(図4)。parental A6細胞ではある程度の細胞間隙が認められるが細胞が単層であるのに対し、GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP発現細胞では細胞間隙が増加し、細胞の重層が明確に観察された。しかし、典型的な細胞間接着構造は保持されていることが確認された。つまり、変異型APC発現細胞は、電子顕微鏡像において、細胞頭頂領域に上皮細胞に特徴的な細胞間接着構造であるタイト・ジャンクションとアドヘレンス・ジャンクションが観察されるのに関わらず、それより下の領域では細胞-細胞間隙が顕著で、また、細胞-基質間隙も顕著であった。それに反して、GFP-fAPC発現細胞では、細胞-細胞間にも細胞-基質間にも間隙が全く見られず、細胞は単層に並列していた。これらの結果から、APCは細胞間接着を強化する機能を持つが、変異型APCはその機能を有せず、細胞-細胞間、細胞-基質間の両方の接着が弱くなっていることが明らかになった。APCのN末端領域には、アクチン細胞骨格を調節する因子であるAsefが結合して細胞運動を促進することが報告されているため(Kawasaki Y, Science; 289(5482):1194-7, 2000)、細胞運動の亢進により細胞接着や形態が変化したと考えられる。

## 【0080】

つまり、全長APCは、細胞-細胞間、細胞-基質間接着を強化する機能を持つものに対し、C末端を欠失した変異型APCではその機能が失われ、かつ細胞運動が亢進する相乗効果によって、細胞が基質からはがれ、重層化するものと考えられた。

## 【0081】

[実施例5] GFP融合全長及び変異型APC発現細胞の蛍光顕微鏡法による観察  
実施例2で得られたGFP融合全長及び変異型APC発現細胞を、抗ZO-1抗体を用いて免疫染色を行い蛍光共焦点顕微鏡法により観察し、parental A6細胞のそれと比較した(図5)。ZO-1は、上皮または内皮細胞層における細胞間接着装置の一つであるタイト・ジャンクションの構成成分であり、正常な上皮の極性を持った細胞では、ZO-1は細胞膜頂端部において細胞を取り巻く連続した周縁に分布する。A6細胞とGFP-fAPC発現細胞では、ZO-1は細胞周縁に連続して観察され、正常に

上皮形態をとっていることが観察された。GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP発現細胞では、重層していない領域の細胞で正常なZO-1の染色が確認された上、重層した領域においても、ZO-1の連続したストランドが観察された。この結果は、GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP発現細胞では細胞間接着は維持された状態で重層していることを示す。

#### 【0082】

これらの知見から、変異型APCは細胞の形態に影響を及ぼし、正常上皮細胞の単層性を阻害することが示された。細胞間接着は維持しながら細胞が重層することから、モデルマウスにおけるポリープ形成現象に類似しており、モデル系として用いることができる。

#### 【0083】

〔実施例6〕 全長APCと変異型APCの細胞内局在

GFP-fAPCは、A6細胞において細胞膜上(basolateral膜, cell cortex)に局在した。類似したコンストラクトであるfAPC-mGFP(APC全長を含むがGFPがAPCの内部に挿入されている公表済みのコンストラクト)がA6細胞においてbasolateral膜に局在することは発明者らによって論文報告されている(Mimori-Kiyosue Y and Tsukita S., J Cell Biol, 154(6):1105-1109, 2001)。この結果と一致して、GFP-cAPCも細胞膜上に局在した。しかし、GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、mAPC-GFPは細胞膜に局在しなかった。このことから、APCはそのC末端のPDZ結合モチーフ、TSVにより細胞膜に局在すると考えられる。APCのC末端には、細胞膜上に局在するPDZタンパク質のひとつであるhDLGが結合することが報告されている。nAPC-GFPは細胞膜上に局在したが、GFP-APC( $\Delta$ TSV)と $\Delta$ cAPC-GFPが細胞膜に局在しないことを考え合わせると、nAPC-GFPは本来APCが局在する機構とは異なって、まだ未同定の細胞膜局在するAPC結合タンパク質により細胞膜にリクルートされていると考えられる。

#### 【0084】

これらの結果から、APCはそのC末端でPDZタンパク質に結合することにより細胞膜に局在し、細胞形態の維持に寄与していると考えられる。

#### 【0085】

## 【発明の効果】

本発明により、細胞の重層化を誘導し得る変異型APCタンパク質が提供された。該タンパク質を発現する細胞は、細胞の重層化を阻害する化合物のスクリーニングに有用である。また本発明者らによって、変異型APCを発現する細胞は細胞間接着構造を保持しているが、細胞の重層化が見られることが、初めて明らかとなった。これらの知見により、ポリープ形成および癌化のメカニズムの解明が大いに期待される。

【 0 0 8 6 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Eisai Co.,Ltd.

&lt;120&gt; Cells expressing exogenous APC mutant protein, and use thereof

&lt;130&gt; E1-A0201

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2829

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Xenopus laevis

&lt;400&gt; 1

Met Ala Ala Ala Ser Tyr Asp Gln Leu Val Lys Gln Val Glu Ala Leu

1

5

10

15

Thr Met Glu Asn Thr Asn Leu Arg Gln Glu Leu Glu Asp Asn Ser Asn

20

25

30

His Leu Thr Lys Leu Glu Thr Glu Ala Thr Asn Met Lys Glu Val Leu

35

40

45

Lys Gln Leu Gln Gly Ser Ile Glu Asp Glu Ala Met Ala Ser Ser Gly

50

55

60

Pro Ile Asp Leu Leu Glu Arg Phe Lys Asp Leu Asn Leu Asp Ser Ser

65

70

75

80

Asn Ile Pro Ala Gly Lys Ala Arg Pro Lys Met Ser Met Arg Ser Tyr

85

90

95

Gly Ser Arg Glu Gly Ser Leu Ser Gly His Ser Gly Glu Cys Ser Pro

100

105

110

Val Pro Val Gly Ser Phe Gln Arg Arg Gly Leu Leu Asn Gly Ser Arg

115

120

125

Glu Ser Ala Gly Tyr Met Glu Glu Leu Glu Lys Glu Arg Leu Leu Leu

130

135

140

Ile Ala Glu His Glu Lys Glu Glu Lys Glu Lys Arg Trp Tyr Tyr Ala

Asp Thr Thr Ser Val Met Ser Ser Asn Ser Thr Tyr Ser Val Pro Arg  
290 295 300

Arg Leu Thr Ser His Leu Gly Thr Lys Val Glu Met Val Tyr Ser Leu  
305 310 315 320

Leu Ser Met Leu Gly Thr His Asp Lys Asp Asp Met Ser Arg Thr Leu  
325 330 335

Leu Ala Met Ser Ser Ser Gln Asp Ser Cys Ile Ala Met Arg Gln Ser  
340 345 350

Gly Cys Leu Pro Leu Leu Ile Gln Leu Leu His Gly Asn Asp Lys Asp  
355 360 365

Ser Val Leu Leu Gly Asn Ser Arg Gly Ser Lys Glu Ala Arg Ala Ser  
370 375 380

Gly Ser Ala Ala Leu Asp Asn Ile Ile His Ser Gln Pro Asp Asp Lys  
385 390 395 400

Arg Gly Arg Arg Glu Ile Arg Val Leu His Leu Leu Glu Gln Ile Arg  
405 410 415

Ala Tyr Cys Glu Thr Cys Trp Glu Trp Gln Glu Ala His Glu Gln Gly  
420 425 430

Met Asp Gln Asp Lys Asn Pro Met Pro Ala Pro Val Asp His Gln Ile  
435 440 445

Cys Pro Ala Val Cys Val Leu Met Lys Leu Ser Phe Asp Glu Glu His  
450 455 460



Arg His Ala Met Asn Glu Leu Gly Gly Leu Gln Ala Ile Ala Glu Leu  
465 470 475 480

Leu Gln Val Asp Cys Glu Met Tyr Gly Leu Ile Asn Asp His Tyr Ser  
485 490 495

Val Thr Leu Arg Arg Tyr Ala Gly Met Ala Leu Thr Asn Leu Thr Phe  
500 505 510

Gly Asp Val Ala Asn Lys Ala Thr Leu Cys Ser Met Lys Ser Cys Met  
515 520 525

Arg Ala Leu Val Ala Gln Leu Lys Ser Glu Ser Glu Asp Leu Gln Gln  
530 535 540

Val Ile Ala Ser Val Leu Arg Asn Leu Ser Trp Arg Ala Asp Val Asn  
545 550 555 560

Ser Lys Lys Thr Leu Arg Glu Val Gly Ser Val Lys Ala Leu Met Glu  
565 570 575

Cys Ala Leu Asp Val Lys Lys Glu Ser Thr Leu Lys Ser Val Leu Ser  
580 585 590

Ala Leu Trp Asn Leu Ser Ala His Cys Thr Glu Asn Lys Ala Asp Ile  
595 600 605

Cys Ser Val Asp Gly Ala Leu Ala Phe Leu Val Ser Thr Leu Thr Tyr

610

615

620

Arg Ser Gln Thr Asn Thr Leu Ala Ile Ile Glu Ser Gly Gly Gly Ile

625

630

635

640

Leu Arg Asn Val Ser Ser Leu Ile Ala Thr Asn Glu Asp His Arg Gln

645

650

655

Ile Leu Arg Glu Asn Asn Cys Leu Gln Thr Leu Leu Gln His Leu Lys

660

665

670

Ser His Ser Leu Thr Ile Val Ser Asn Ala Cys Gly Thr Leu Trp Asn

675

680

685

Leu Ser Ala Arg Asn Ala Lys Asp Gln Glu Gly Leu Trp Asp Met Gly

690

695

700

Ala Val Ser Met Leu Lys Asn Leu Ile His Ser Lys His Lys Met Ile

705

710

715

720

Ala Met Gly Ser Ala Ala Ala Leu Arg Asn Leu Met Ala Asn Arg Pro

725

730

735

Ala Lys Tyr Lys Asp Ala Asn Ile Met Ser Pro Gly Ser Ser Val Pro

740

745

750

Ser Leu His Val Arg Lys Gln Lys Ala Leu Glu Ala Glu Leu Asp Ala

755

760

765

Gln His Leu Ser Glu Thr Phe Asp Asn Ile Asp Asn Leu Ser Pro Lys  
770 775 780

Thr Thr His Arg Asn Lys Gln Arg His Lys Gln Asn Leu Cys Ser Glu  
785 790 795 800

Tyr Ala Leu Asp Ser Ser Arg His Asp Asp Ser Ile Cys Arg Ser Asp  
805 810 815

Asn Phe Ser Ile Gly Asn Leu Thr Val Leu Ser Pro Tyr Ile Asn Thr  
820 825 830

Thr Val Leu Pro Gly Ser Ser Ser Pro Arg Pro Thr Met Asp Gly Ser  
835 840 845

Arg Pro Glu Lys Asp Arg Glu Arg Thr Ala Gly Leu Gly Asn Tyr His  
850 855 860

Ser Thr Thr Glu Ser Ser Gly Asn Ser Ser Lys Arg Ile Gly Ile Gln  
865 870 875 880

Leu Ser Thr Thr Ala Gln Ile Ser Lys Val Met Asp Glu Val Ser Asn  
885 890 895

Ile His Leu Val Gln Glu Asn Arg Ser Ser Gly Ser Ala Ser Glu Met  
900 905 910

His Cys Met Ser Asp Glu Arg Asn Ser Gln Arg Lys Pro Ser Ser Asn  
915 920 925

His Pro Gln Ser Asn Pro Phe Thr Phe Thr Lys Ala Glu Ser Ser Thr  
930 935 940

Arg Gly Cys Pro Val Ala Phe Met Lys Met Glu Tyr Lys Met Ala Ser  
945 950 955 960

Asn Asp Ser Leu Asn Ser Val Ser Ser Thr Glu Gly Tyr Gly Lys Arg  
965 970 975

Gly Gln Val Lys Pro Ser Val Glu Ser Tyr Ser Glu Asp Asp Glu Ser  
980 985 990

Lys Phe Phe Ser Tyr Gly Gln Tyr Pro Ala Gly Leu Ala His Lys Ile  
995 1000 1005

Gln Ser Ala Asn His Met Asp Asp Asn Asp Thr Glu Leu Asp Thr Pro  
1010 1015 1020

Ile Asn Tyr Ser Leu Lys Tyr Ser Asp Glu Gln Leu Asn Ser Gly Arg  
1025 1030 1035 1040

Gln Ser Pro Thr Gln Asn Glu Arg Trp Ser Arg Pro Lys His Ile Ile  
1045 1050 1055

Asp Ser Glu Met Lys Gln Ser Glu Gln Arg Gln Pro Arg Thr Thr Lys  
1060 1065 1070

Thr Thr Tyr Ser Ser Tyr Thr Glu Asn Lys Glu Glu Lys His Lys Lys

1075	1080	1085
Phe Pro Pro His Phe Asn Gln Ser Glu Asn Val Pro Ala Tyr Thr Arg		
1090	1095	1100
Ser Arg Gly Ala Asn Asn Gln Val Asp Gln Ser Arg Val Ser Ser Asn		
1105	1110	1115 1120
Leu Ser Asn Asn Ser Lys Ala Ser Lys Pro His Cys Gln Val Asp Asp		
1125	1130	1135
Tyr Asp Asp Asp Lys Thr Thr Asn Phe Ser Glu Arg Tyr Ser Glu Glu		
1140	1145	1150
Glu Gln Gln Glu Asp Glu Thr Glu Arg Gln Asn Lys Tyr Asn Ile Lys		
1155	1160	1165
Ala Tyr Ala Ser Glu Glu His His Gly Glu Gln Pro Ile Asp Tyr Ser		
1170	1175	1180
Arg Lys Tyr Ser Thr Asp Val Pro Ser Ser Ala Gln Lys Pro Ser Phe		
1185	1190	1195 1200
Pro Tyr Ser Asn Asn Ser Ser Lys Gln Lys Pro Lys Lys Glu Gln Val		
1205	1210	1215
Ser Ser Asn Ser Asn Thr Pro Thr Pro Ser Pro Asn Ser Asn Arg Gln		
1220	1225	1230

Asn Gln Leu His Pro Asn Ser Ala Gln Ser Arg Pro Gly Leu Asn Arg  
1235 1240 1245

Pro Lys Gln Ile Pro Asn Lys Pro Pro Ser Ile Asn Gln Glu Thr Ile  
1250 1255 1260

Gln Thr Tyr Cys Val Glu Asp Thr Pro Ile Cys Phe Ser Arg Gly Ser  
1265 1270 1275 1280

Ser Leu Ser Ser Leu Ser Ser Ala Glu Asp Glu Ile Glu Gly Arg Glu  
1285 1290 1295

Arg Asn Ser Arg Gly Gln Glu Ser Asn Asn Thr Leu Gln Ile Thr Glu  
1300 1305 1310

Pro Lys Glu Ile Ser Ala Val Ser Lys Asp Gly Ala Val Asn Glu Thr  
1315 1320 1325

Arg Ser Ser Val His His Thr Arg Thr Lys Asn Asn Arg Leu Gln Thr  
1330 1335 1340

Ser Asn Ile Ser Pro Ser Asp Ser Ser Arg His Lys Ser Val Glu Phe  
1345 1350 1355 1360

Ser Ser Gly Ala Lys Ser Pro Ser Lys Ser Gly Ala Gln Thr Pro Lys  
1365 1370 1375

Ser Pro Pro Glu His Tyr Val Gln Glu Thr Pro Leu Met Phe Ser Arg  
1380 1385 1390

Cys Thr Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe Glu Ser His Ser Ile Ala  
1395 1400 1405

Ser Ser Ile Ala Ser Ser Val Ala Ser Glu His Met Ile Ser Gly Ile  
1410 1415 1420

Ile Ser Pro Ser Asp Leu Pro Asp Ser Pro Gly Gln Thr Met Pro Pro  
1425 1430 1435 1440

Ser Arg Ser Lys Thr Pro Pro Pro Pro Gln Thr Val Gln Ala Lys Lys  
1445 1450 1455

Asp Gly Ser Lys Pro Ile Val Pro Asp Glu Glu Arg Gly Lys Val Ala  
1460 1465 1470

Lys Thr Ala Val His Ser Ala Ile Gln Arg Val Gln Val Leu Gln Glu  
1475 1480 1485

Ala Asp Thr Leu Leu His Phe Ala Thr Glu Ser Thr Pro Asp Gly Phe  
1490 1495 1500

Ser Cys Ala Ser Ser Leu Ser Ala Leu Ser Leu Asp Glu Pro Tyr Ile  
1505 1510 1515 1520

Gln Lys Asp Val Gln Leu Lys Ile Met Pro Pro Val Leu Glu Asn Asp  
1525 1530 1535

Gln Gly Asn Lys Ala Glu Pro Glu Lys Glu Phe Ile Asp Asn Lys Ala

1540

1545

1550

Lys Lys Glu Asp Lys Arg Ser Glu Gln Glu Lys Asp Met Leu Asp Asp

1555

1560

1565

Thr Asp Asp Asp Ile Asp Ile Leu Glu Glu Cys Ile Ile Ser Ala Met

1570

1575

1580

Pro Arg Lys Pro Ser Arg Lys Asn Lys Lys Val Pro Gln Pro Thr Pro

1585

1590

1595

1600

Gly Lys Pro Pro Pro Pro Val Ala Arg Lys Pro Ser Gln Leu Pro Val

1605

1610

1615

Tyr Lys Leu Leu Ser Ser Gln Asn Arg Leu Gln Thr Gln Lys His Val

1620

1625

1630

Asn Phe Thr His Ser Asp Asp Met Pro Arg Val Tyr Cys Val Glu Gly

1635

1640

1645

Thr Pro Ile Asn Phe Ser Thr Ala Thr Ser Leu Ser Asp Leu Thr Ile

1650

1655

1660

Glu Ser Pro Pro Ser Glu Pro Thr Asn Asp Gln Pro Asn Thr Asp Ser

1665

1670

1675

1680

Leu Ser Thr Asp Leu Glu Lys Arg Asp Thr Ile Pro Thr Glu Gly Arg

1685

1690

1695



Ser Thr Asp Asp Thr Asp Ala Ser Lys Pro Leu Asn Pro Thr Thr Val  
1700 1705 1710

Leu Asp Glu Asp Lys Ala Glu Glu Gly Asp Ile Leu Ala Glu Cys Ile  
1715 1720 1725

His Ser Ala Met Pro Lys Gly Lys Ser His Lys Pro Tyr Arg Val Lys  
1730 1735 1740

Lys Ile Met Asp Gln Ile Asn His Thr Ser Ala Ala Thr Ser Ser Gly  
1745 1750 1755 1760

Asn Ser Arg Ser Met Gln Glu Thr Asp Lys Asn Lys Pro Thr Ser Pro  
1765 1770 1775

Val Lys Pro Met Pro Gln Ser Ile Gly Phe Lys Glu Arg Leu Lys Lys  
1780 1785 1790

Asn Thr Glu Leu Lys Leu Asn Pro Asn Ser Glu Asn Gln Tyr Cys Asp  
1795 1800 1805

Pro Arg Lys Pro Ser Ser Lys Lys Pro Ser Lys Val Ala Asn Glu Lys  
1810 1815 1820

Ile Pro Asn Asn Glu Glu Arg Thr Lys Gly Phe Ala Phe Asp Ser Pro  
1825 1830 1835 1840

His His Tyr Thr Pro Ile Glu Gly Thr Pro Tyr Cys Phe Ser Arg Asn  
1845 1850 1855

Asp Ser Leu Ser Ser Leu Asp Phe Glu Asp Asp Asp Ile Asp Leu Ser  
1860 1865 1870

Lys Glu Lys Ala Glu Leu Arg Lys Glu Lys Gly Thr Lys Asp Thr Asp  
1875 1880 1885

Gln Lys Val Lys Tyr Lys His Glu Asn Arg Ala Ile Asn Pro Met Gly  
1890 1895 1900

Lys Gln Asp Gln Thr Gly Pro Lys Ser Leu Gly Gly Arg Asp Gln Pro  
1905 1910 1915 1920

Lys Ala Leu Val Gln Lys Pro Thr Ser Phe Ser Ser Ala Ala Lys Gly  
1925 1930 1935

Thr Gln Asp Arg Gly Gly Ala Thr Asp Glu Lys Met Glu Asn Phe Ala  
1940 1945 1950

Ile Glu Asn Thr Pro Val Cys Phe Ser Arg Asn Ser Ser Leu Ser Ser  
1955 1960 1965

Leu Ser Asp Ile Asp Gln Glu Asn Asn Asn Lys Glu Thr Glu Pro Leu  
1970 1975 1980

Lys Gln Thr Gly Thr Ser Glu Thr Gln Leu Gly Leu Arg Arg Pro Gln  
1985 1990 1995 2000

Thr Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Ser Phe His Val Glu Asp Thr Pro Val

2005

2010

2015

Cys Phe Ser Arg Asn Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ser Ile Asp Ser Glu

2020

2025

2030

Asp Asp Leu Leu Gln Glu Cys Ile Ser Ser Ala Met Pro Lys Lys Arg

2035

2040

2045

Lys Pro Ser Lys Ile Lys Asn Glu Val Gly Lys Ser Arg Ser Asn Ser

2050

2055

2060

Val Gly Gly Ile Leu Ala Glu Glu Pro Asp Leu Thr Leu Asp Leu Arg

2065

2070

2075

2080

Asp Ile Gln Ser Pro Asp Ser Glu Asn Ala Phe Ser Pro Asp Ser Glu

2085

2090

2095

Asn Phe Asp Trp Lys Ala Ile Gln Glu Gly Ala Asn Ser Ile Val Ser

2100

2105

2110

Arg Leu His Gln Ala Ala Ala Ala Gly Ser Leu Ser Arg Gln Gly Ser

2115

2120

2125

Ser Asp Ser Asp Ser Ile Leu Ser Leu Lys Ser Gly Ile Ser Leu Gly

2130

2135

2140

Ser Pro Phe His Leu Thr Leu Asp Lys Glu Glu Lys Thr Ile Thr Ser

2145

2150

2155

2160

Asn Lys Gly Pro Lys Ile Leu Lys Pro Ala Glu Lys Ser Ala Leu Glu  
2165 2170 2175

Asn Lys Lys Thr Glu Glu Glu Pro Lys Gly Ile Lys Gly Gly Lys Lys  
2180 2185 2190

Val Tyr Lys Ser Leu Ile Thr Gly Lys Ser Arg Ser Ser Ser Asp Phe  
2195 2200 2205

Ser Ser His Cys Lys Gln Ser Val Gln Thr Asn Met Pro Ser Ile Ser  
2210 2215 2220

Arg Gly Arg Thr Met Ile His Ile Pro Gly Val Arg Ala Ser Ser Pro  
2225 2230 2235 2240

Ser Thr Ser Pro Val Ser Lys Lys Gly Pro Val Phe Lys Asn Val Pro  
2245 2250 2255

Ser Lys Gly Ser Asn Glu Asn Pro Ser Ser Ser Ser Ser Pro Lys Gly  
2260 2265 2270

Thr Lys Pro Leu Lys Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ser Arg Pro Ser Ser  
2275 2280 2285

Thr Pro Gly Gly Ser Ser Lys Gly Asn Ser Arg Ser Gly Ser Arg Asp  
2290 2295 2300

Ser Ala Ser Ser Arg Pro Ser Pro Gln Pro Leu Ser Arg Pro Leu Gln  
2305 2310 2315 2320

Ser Pro Gly Arg Asn Ser Ile Ser Pro Gly Lys Asn Gly Ile Ser Pro  
2325 2330 2335

Pro Asn Lys Phe Ser Gln Leu Pro Arg Thr Thr Ser Pro Ser Thr Ala  
2340 2345 2350

Ser Thr Lys Ser Ser Gly Ser Gly Arg Met Ser Tyr Thr Ser Pro Gly  
2355 2360 2365

Arg Gln Leu Ser Gln Pro Asn Leu Ser Lys Gln Ser Gly Leu Pro Lys  
2370 2375 2380

Thr His Ser Ser Ile Pro Arg Ser Glu Ser Ala Ser Lys Ser Leu Asn  
2385 2390 2395 2400

Gln Asn Val Asn Thr Gly Ser Asn Lys Lys Val Glu Leu Ser Arg Met  
2405 2410 2415

Ser Ser Thr Lys Ser Ser Gly Ser Glu Ser Asp Arg Ser Glu Arg Pro  
2420 2425 2430

Ala Leu Val Arg Gln Ser Thr Phe Ile Lys Glu Ala Pro Ser Pro Thr  
2435 2440 2445

Leu Arg Arg Lys Leu Glu Glu Ser Ala Ser Phe Glu Ser Leu Ser Ser  
2450 2455 2460

Ser Ser Arg Ala Asp Ser Pro Pro Arg Ser Gln Thr Gln Thr Pro Ala

2465                      2470                      2475                      2480

Leu Ser Pro Ser Leu Pro Asp Met Ala Leu Ser Thr His Ser Ile Gln

2485                      2490                      2495

Ala Gly Gly Trp Arg Lys Met Pro Pro Asn Leu Asn Pro Ala Ala Glu

2500                      2505                      2510

His Gly Asp Ser Arg Arg Arg His Asp Ile Ser Arg Ser His Ser Glu

2515                      2520                      2525

Ser Pro Ser Arg Leu Pro Ile Thr Arg Ser Gly Thr Trp Lys Arg Glu

2530                      2535                      2540

His Ser Lys His Ser Ser Ser Leu Pro Arg Val Ser Thr Trp Arg Arg

2545                      2550                      2555                      2560

Thr Gly Ser Ser Ser Ser Ile Leu Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Glu

2565                      2570                      2575

Lys Ala Lys Ser Glu Asp Glu Lys Gln Gln Val Cys Ser Phe Pro Gly

2580                      2585                      2590

Pro Arg Ser Glu Cys Ser Ser Ser Ala Lys Gly Thr Trp Arg Lys Ile

2595                      2600                      2605

Lys Glu Ser Glu Ile Leu Glu Thr Pro Ser Asn Gly Ser Ser Ser Thr

2610                      2615                      2620

Ile Ala Glu Ser Asn Cys Ser Leu Glu Ser Lys Thr Leu Val Tyr Gln  
2625                      2630                      2635                      2640

Met Ala Pro Ala Val Ser Lys Thr Glu Asp Val Trp Val Arg Ile Glu  
                         2645                      2650                      2655

Asp Cys Pro Ile Asn Asn Pro Arg Ser Gly Arg Ser Pro Thr Gly Asn  
                         2660                      2665                      2670

Ser Pro Pro Val Ile Asp Asn Val Leu Asp Gln Gly Gln Lys Glu Glu  
                         2675                      2680                      2685

Ala Ala Lys Asp Cys His Thr Arg His Asn Ser Gly Asn Gly Asn Val  
                         2690                      2695                      2700

Pro Leu Leu Glu Asn Arg Gln Lys Ser Phe Ile Lys Val Asp Gly Leu  
2705                      2710                      2715                      2720

Asp Thr Lys Gly Thr Asp Pro Lys Ser Leu Ile Asn Asn Gln Gln Glu  
                         2725                      2730                      2735

Thr Asn Glu Asn Thr Val Ala Glu Arg Thr Ala Phe Ser Ser Ser Ser  
                         2740                      2745                      2750

Ser Ser Lys His Ser Ser Pro Ser Gly Thr Val Ala Ala Arg Val Thr  
                         2755                      2760                      2765

Pro Phe Asn Tyr Asn Pro Ser Pro Arg Lys Ser Asn Gly Glu Asn Ser  
                         2770                      2775                      2780

Thr Ser Arg Pro Ser Gln Ile Pro Thr Pro Val Thr Asn Ser Thr Lys  
2785                      2790                      2795                      2800

Lys Arg Asp Ser Lys Thr Glu Thr Thr Asp Ser Ser Gly Ser Gln Ser  
                    2805                      2810                      2815

Pro Lys Arg His Ser Gly Ser Tyr Leu Val Thr Ser Val  
                    2820                      2825

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 2

cgacgcgtaa tgcattttct ccagactctg

30

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 3

ggaattcgga tcctcacacc agataagaac cagagtgcc

39

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 4

cgacgcgtat ggctgctgct tcgtatgatac agt

33

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 5

cgacgcgtac ctgctgttct ttccctgtc

29

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 6

ctagctagcc tcggcaacta ccattcg

27

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7

attagagctc actctagac

19

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 アフリカツメガエルAPCタンパク質のドメイン構成図と、本発明に用いられたGFP融合全長及び変異型APCを模式的に示す図である。

【図2】 Parental A6細胞、及び、GFP-fAPC、GFP-APC( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFPを安定に発現するA6細胞株の位相差顕微鏡写真である。

【図3】 変異型APCを発現する細胞が重層化することを示す走査型電子顕微鏡写真である。

【図4】 変異型APCを発現する細胞が重層化することを示す透過型電子顕微鏡写真である。

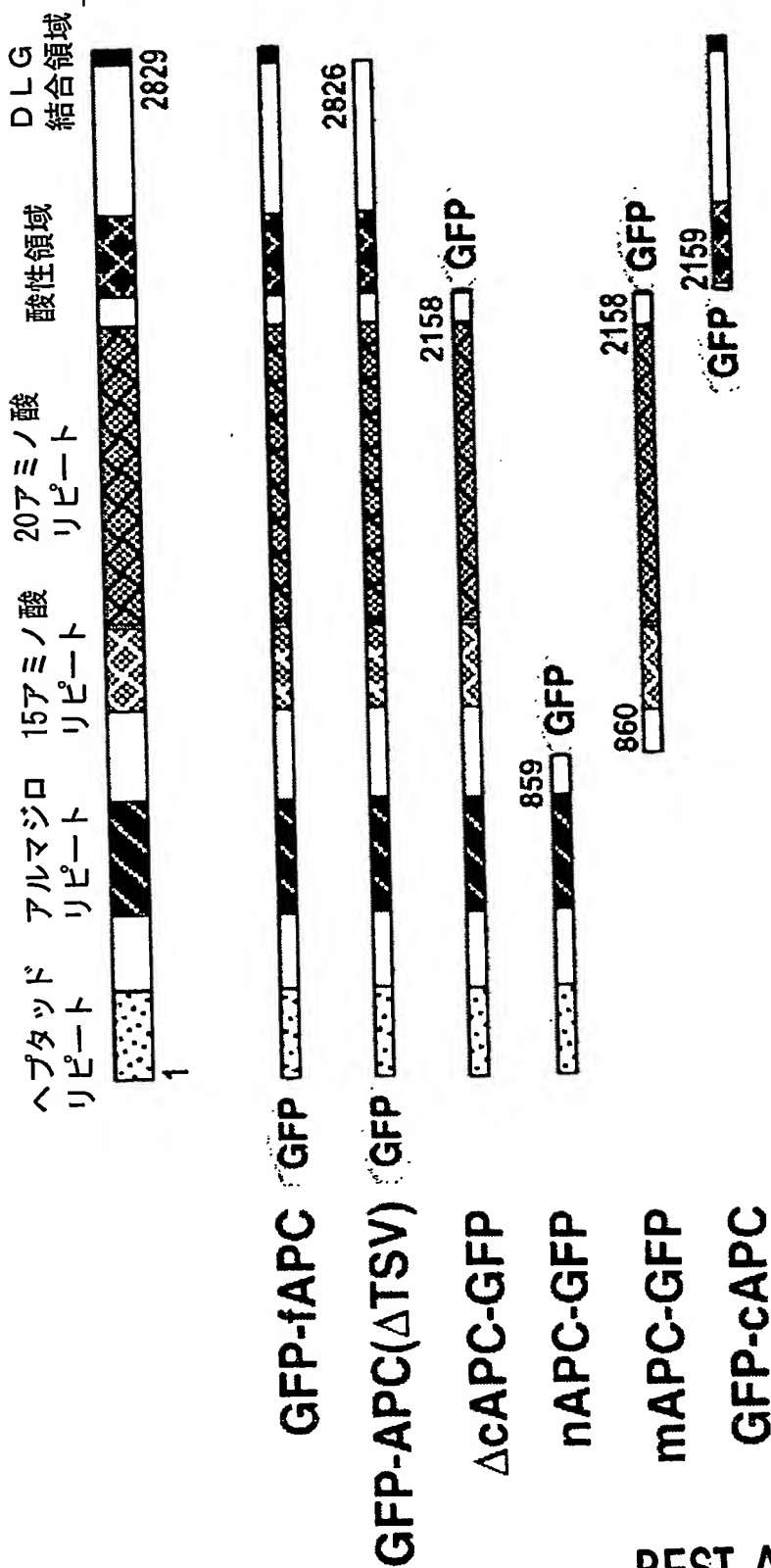
【図5】 変異型APCを発現する細胞が重層化後も細胞が細胞間接着構造を形成していることを示す写真である。抗ZO-1抗体でTJタンパク質ZO-1を染色した

。

【書類名】

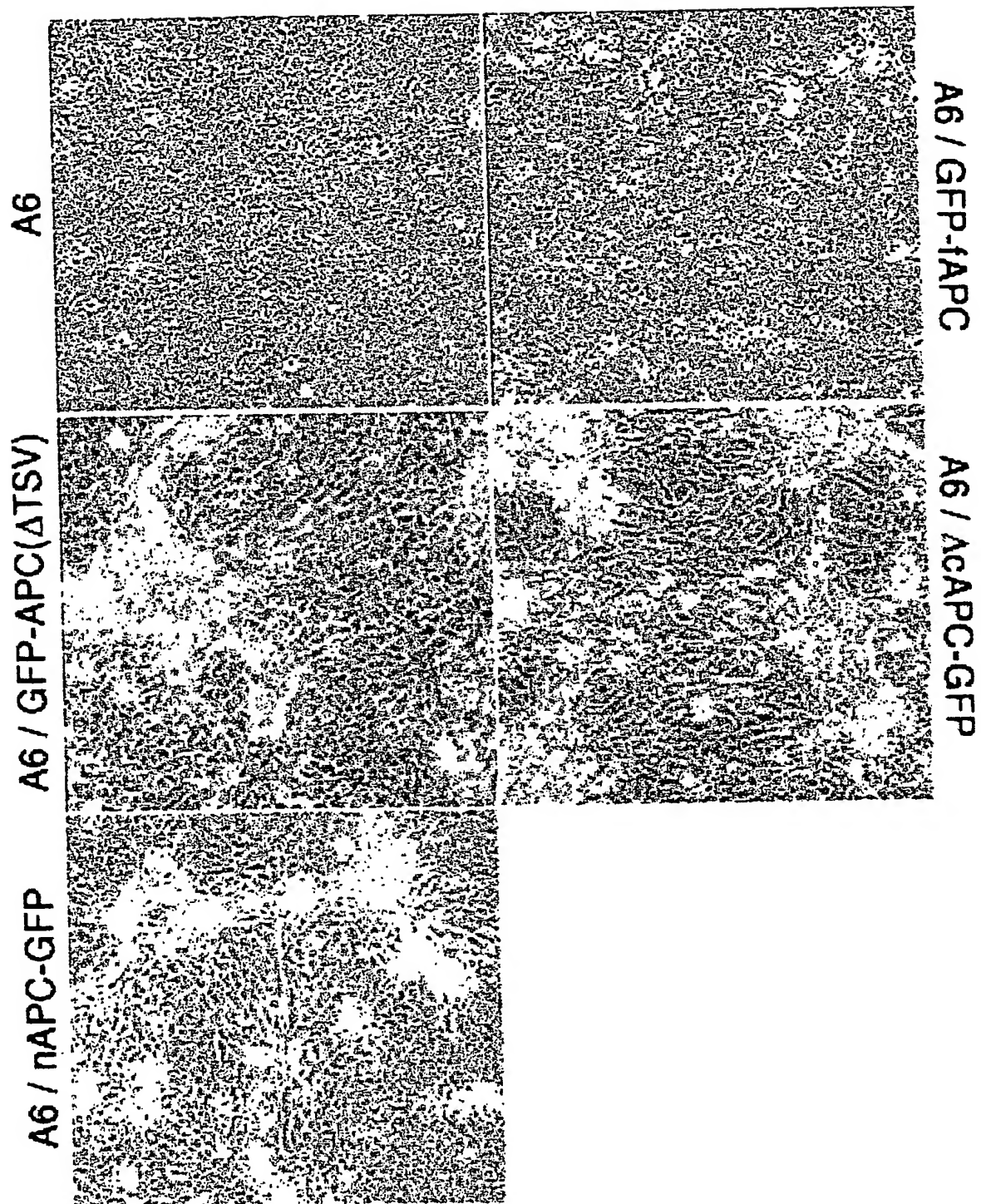
図面

【図 1】



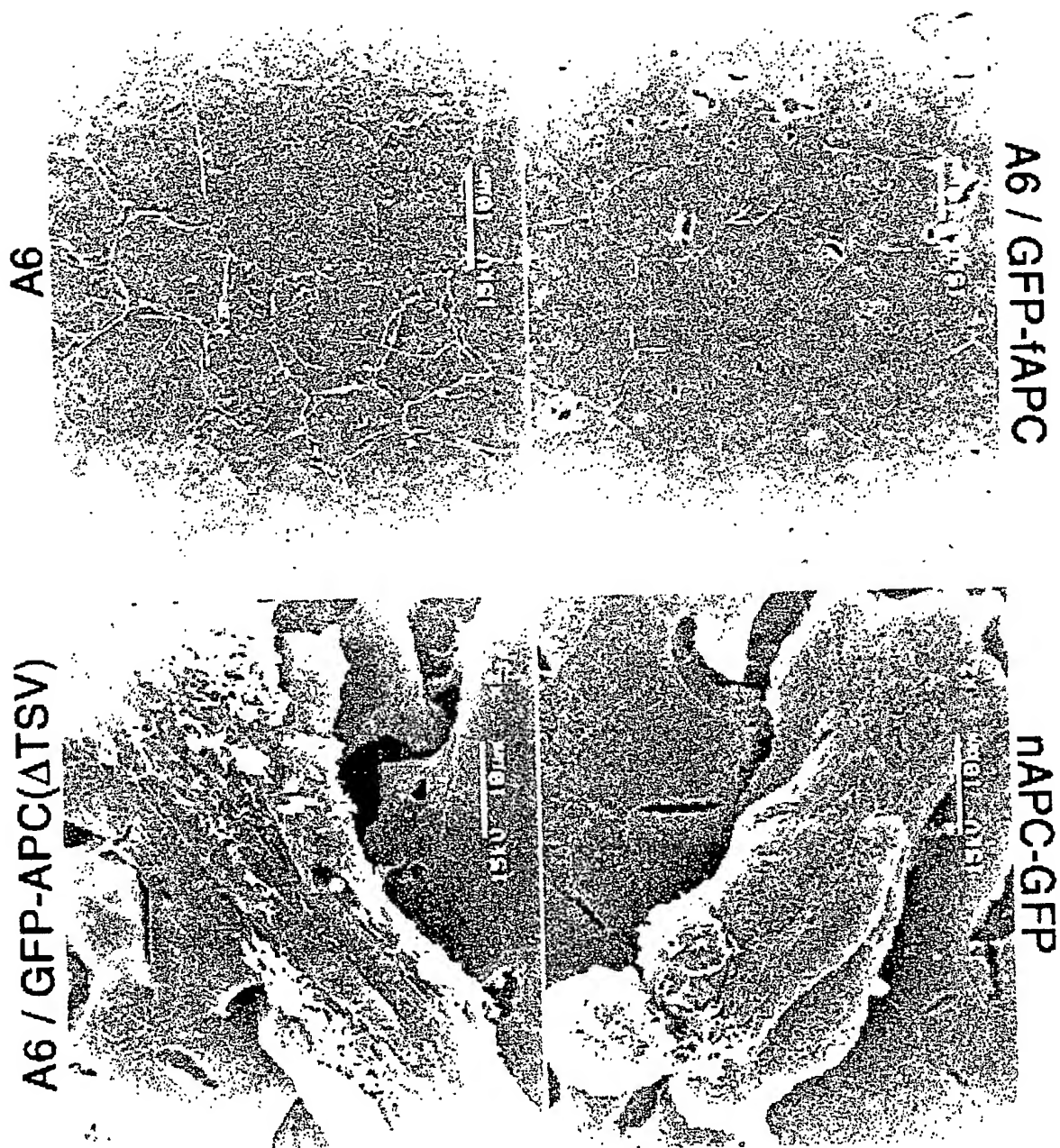
BEST AVAILABLE COPY

【図 2】



BEST AVAILABLE COPY

【図 3】



BEST AVAILABLE COPY

【図4】

A6



A6 / GFP-fAPC



A6 / ΔcAPC-GFP

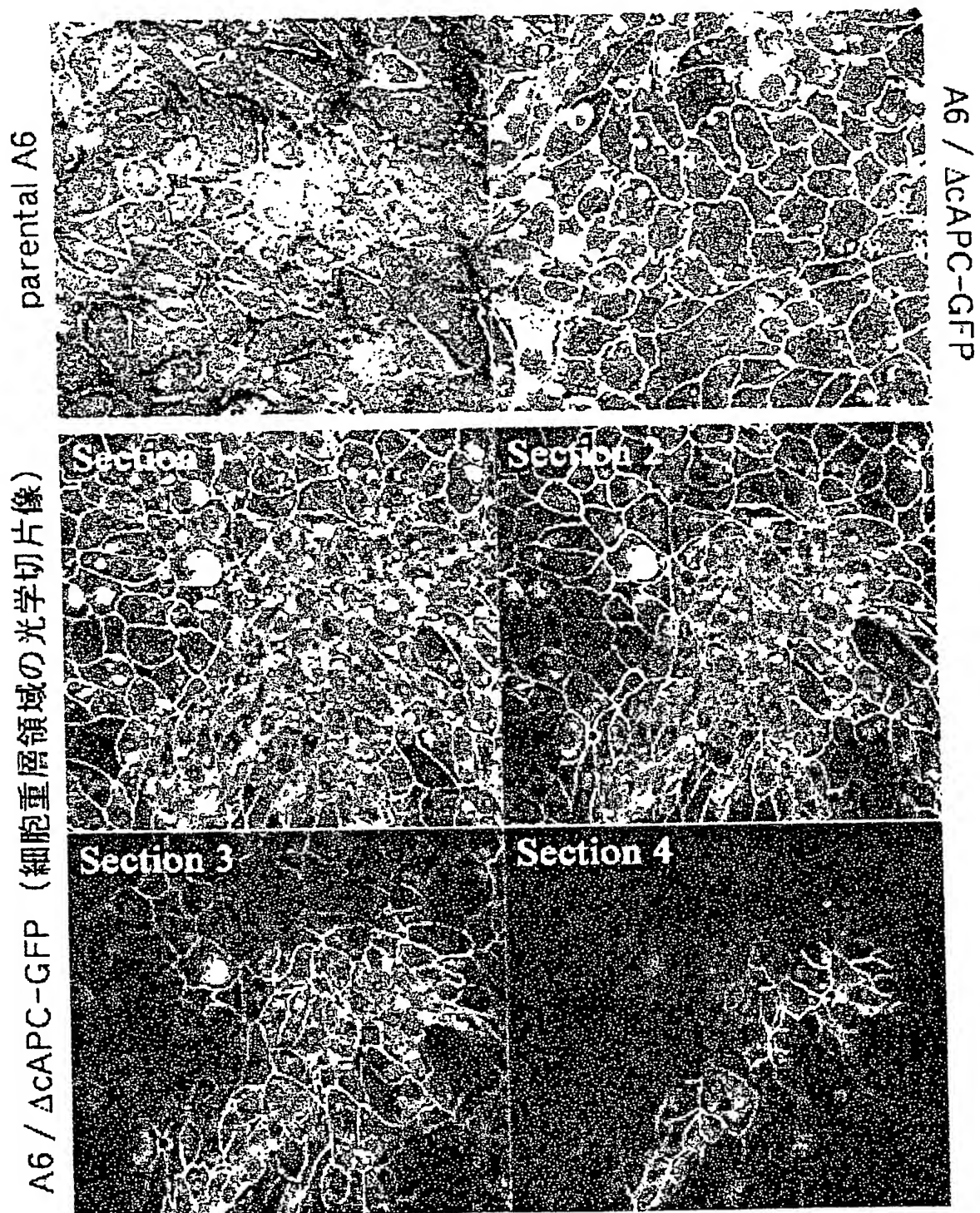


A6 / GFP-APC(ΔTSV)





【図 5】



BEST AVAILABLE COPY



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 正常および変異型APCの細胞形態や運動に関わる機能を明らかにすることにある。さらに本発明は、得られた知見を基に変異型APCタンパク質の用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 蛋白質を可視化する技術を用い、アフリカツメガエル腎臓上皮培養細胞A6において、GFP融合全長及び変異型APCを安定に発現する細胞株を得た。この細胞を用い、C末端領域を欠損した変異型APCは細胞の重層化を誘導することを見出した。さらに、変異型APCの発現細胞株によって重層化した細胞は、細胞間接着構造を保持しており、個体（マウス）におけるポリープ形成と類似した現象であることを確認した。

【選択図】 なし

特願 2002-241487

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社